

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-350413
(43)Date of publication of application : 04.12.2002

(51)Int.Cl.

G01N 30/48
C07B 57/00
C07C 33/46
C07C 39/15
C07C 49/657
C07C 49/92
C07D301/32
C07D303/04
C07D303/48
C07D487/08
G01N 27/447
G01N 30/88
// C07M 7:00

(21)Application number : 2001-155232

(71)Applicant : DAICEL CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 24.05.2001

(72)Inventor : OKAMOTO YOSHIO
BEZHAN CHANKVETADZE
YAMAMOTO TOMOYO
WAKITA TSUNEKI

(54) SEPARATION COLUMN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a separation column having stable frit producible easily with excellent reproducibility, and a separation method of an optical isomer by using the column.

SOLUTION: This separation column is characterized by having the frit acquired by dehydration condensation reaction of alkoxy silane. A manufacturing method of the separation column for performing the dehydration condensation reaction in the column where alkoxy silane solution is introduced is also provided. The separation method of the optical isomer is characterized by separating the optical isomer by using the separation column.

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]A column for separation having the fritto obtained by a dehydrating condensation reaction of alkoxy silane.

[Claim 2]The column for separation according to claim 1, wherein a bulking agent is held inside.

[Claim 3]The column for separation according to claim 1 or 2, wherein a bulking agent is a bulking agent for optical resolution.

[Claim 4]The column for separation according to claim 3, wherein a bulking agent consists of polysaccharide derivatives.

[Claim 5]The column for separation according to any one of claims 1 to 4 being a column for high performance chromatography.

[Claim 6]The column for separation according to any one of claims 1 to 4 being a column used for capillary electrophoresis.

[Claim 7]A manufacturing method of the column for separation according to any one of claims 1 to 6 performing a dehydrating condensation reaction within a column which introduced an alkoxy silane solution.

[Claim 8]A separation method of an optical isomer characterized by separating an optical isomer using the column for separation according to any one of claims 1 to 6.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the column for separation used for a liquid chromatography method, capillary electrophoresis, the gas chromatography method, etc. which are separation analysis means, its manufacturing method, and the separation method of the optical isomer using it. It is related with the outstanding column for optical isomer separation which makes possible especially high sensitivity, a minute amount, and a rapid analysis.

[0002]

[Description of the Prior Art] Although an optical isomer exists in many organic compounds, physical properties, such as physical and chemical nature of these optical isomers, for example, the boiling point, the melting point, and solubility, are completely the same. However, between optical isomers, it is known widely that a difference will often be seen in respect of physiology activity. for this reason, in the field of drugs, there is often a case where that drug effect and a difference remarkable in respect of toxicity are seen, and it smells also in perfume and a food additive between optical isomers, and a difference may be seen at a clever point.

[0003] Although a means to manufacture only the basis of such a social request and one of the two of an optical isomer is examined widely, the art of analyzing an optical isomer simultaneously was also studied and it has progressed. By physical and a means of an optical isomer by which the difference among physical properties, such as the usual boiling point, solubility, a distribution coefficient, and a size of an electric charge, separates since chemical nature is completely the same, it cannot be analyzed as having stated previously.

[0004] Then, the optical isomer separation method by a high-performance-chromatography (HPLC) method has progressed as separation of the optical isomer which can identify the three-dimensional arrangement between optical isomers on the conditions near a room temperature (dissymmetry discernment), and tools of analysis. With the column for HPLC used here, the chiral stationary phase which made the dissymmetry discernment agent itself or the dissymmetry discernment agent support on a suitable carrier is used. For example, optical activity polymethacrylic acid triphenylmethyl (JP,57-150432,A), Cellulose, an amylose derivative (Y. Okamoto, M.Kawashima and K.Hatada, J.Am.Chem.Soc., 106, 5337, 1984), an ovomucoid (JP,63-307829,A); etc. are developed. It is known that the optical-resolution column which made the cellulosic and the amylose derivative support on silica gel also in the chiral stationary phase for these HPLC has high dissymmetry discernment ability to a very broad compound.

[0005] However, in these HPLC method, although a certain amount of quantity (more than about 0.1microg) of a sample is required in the case of separation, since the absolute magnitude of a sample is little very much in order to use in fields mentioned above, such as a biogenic substance and metabolic turnover research, -- the sample of 10 - 0.1pg -- accuracy -- it can analyze highly -- a technique is desired. By the HPLC method, since the amount of mobile phase solvents is discharged so much, reduction of these solvent amounts is pointed out from a point of the environmental problem.

[0006] Research of the optical-resolution art by the capillary electrophoresis (CE) with which the separation technique differs from the HPLC method in recent years is advanced. Capillary electrophoresis is impressing voltage to both ends using the small tube called a capillary tube, and is the art in which the difference between an electric charge, size, etc. separates a sample. The CZE (capillary zone electrophoresis) method performed by the optical-resolution method using a CE method adding cyclodextrin and its derivative in migration liquid conventionally, MEKC (micell **** chromatography) -- law is known well (Journal of Chromatography A, 659 (1994), 449). except for cyclodextrin -- heparin (Anal. Chem. and 66 (1994).) The example which added galactosamine, glucuronic acid, fucose (JP,9-143202,A), dextran (Journal of Chromatography A, 735 (1996), 345), etc. which are 3054 and a sulfonated polysaccharide to migration liquid is reported.

[0007] The manufacturing method of a capillary column takes advanced art. The production art of the fritto for

holding a bulking agent in a capillary tube especially poses a problem, and this is related to the problem of the air bubbles which intercept energization in capillary electrophoresis.

[0008] Although the method of making silica gel or its derivative sinter was conventionally used for production of fritto, adjustment of the length of fritto is difficult, and also production took advanced art that a heating section breaks easily. The sake, Fritto production. Needlessness. (Anal. Chem., vol.68, No.17, 2753-2757, 1996, Electrophoresis, vol.20, No.1, 43-49, 1999, Anal. Chem. to which research of fritto Rhesca Lamb to do is also done. vol.72, No.15, 3605-3610, 2000, Chromatography, vol.21, No.3, 195-202, 2000.

[0009] The purpose of this invention is to provide the separation method of the column for separation with the fritto which reappearance is good, can manufacture simply and is rich in stability, and the optical isomer using it.

[0010]

[Means for Solving the Problem] This invention persons came to complete this invention, as a result of repeating examination wholeheartedly in order to solve the above-mentioned technical problem.

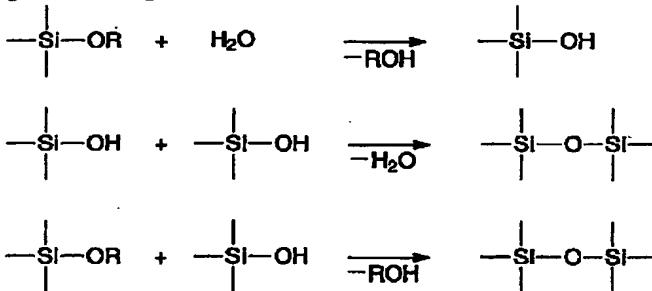
[0011] Namely, a column for separation, wherein this invention has the fritto obtained by a dehydrating condensation reaction of alkoxy silane. It is a separation method of an optical isomer separating an optical isomer using a manufacturing method of a column for separation which performs a dehydrating condensation reaction, and this column for separation within a column which introduced an alkoxy silane solution.

[0012]

[Embodiment of the Invention] The dehydrating condensation reaction of the alkoxy silane in this invention consists of an elementary process called hydrolysis of silicate as shown in a formula (1), and the condensation reaction of the silanol group following it.

[0013]

[Formula 1]



(1)

[0014] Here, R is at least one sort chosen from the alkyl group of the aromatic hydrocarbon group which may have no replacing or a substituent, a hydrogen atom, and the carbon numbers 1-20. As desirable alkoxy silane used by this invention, a tetramethoxy silane, a tetraethoxysilane, trimethoxysilane, triethoxysilane, phenyltrimethoxysilane, etc. are mentioned. Copolymerization may be carried out, for example to dihydric alcohol, such as ethylene glycol, ester species, etc. only not only in an alkoxy silane simple substance.

[0015] Of a dehydrating condensation reaction of such alkoxy silane, a matrix which carried out three-dimensional bridge construction is formed, and this serves as fritto of this invention by it. In order to manufacture a column of this invention which has this fritto, after preparing an alkoxy silane solution in a suitable solvent beforehand, it is preferred to introduce this solution in a column and to perform a dehydrating condensation reaction at 0 to 180 **.

[0016] As a solvent used for preparation of an alkoxy silane solution, Ketones, such as water, acetone, methyl ethyl ketone, and an acetophenone, Ethyl acetate, methyl acetate, propyl acetate, methyl propionate, methyl benzoate, Ester solvents, such as phenyl acetate, a tetrahydrofuran, 1,4-dioxane, Ethers solvents, such as diethylether and tert-butylmethyl ether, Amide series solvents, such as N,N-dimethylformamide and N,N-dimethylacetamide, Imide system solvents, such as N,N-dimethylimidazolidinone, chloroform, Halogen system solvents, such as a methylene chloride, a carbon tetrachloride, and 1,2-dichloroethane, Pentane, petroleum ether, hexane, heptane, octane, benzene, Hydrocarbon system solvents, such as toluene, xylene, and mesitylene, methanol, Amine system solvents, such as alcohols solvents, such as ethanol, propanol, and butanol, diethylamine, triethylamine, and pyridine, are mentioned, and these solvents may be independent or may be used as two or more sorts of partially aromatic solvents. As a hydrolysis catalyst, bases, such as acid, such as acetic acid, chloride, and sulfuric acid, or ammonium, and sodium hydroxide, are added, and it is considered as a solvent for preparation of an alkoxy silane solution. As for concentration of alkoxy silane in an alkoxy silane solution, 0.05 to 5 % of the weight is preferred.

[0017] Although an introduction amount of an alkoxy silane solution into a column does not have restriction in particular, it is preferred to introduce so that the length of an alkoxy silane solution portion in a column may be set to 0.2–4 cm and also 0.5–2 cm.

[0018] A column used for this invention will not be limited especially if normal use is carried out, but as for an inside diameter of a column, 1–5000 micrometers is preferred, its 10–1000 micrometers are still more preferred, and especially its 10–200 micrometers are preferred. Although what kind of length it may be sufficient as the length of a column, 20–100 cm is preferred.

[0019] Construction material of a column will not be limited especially if use of liquid chromatography or electrophoresis analysis is presented, but [especially] construction material containing glass or silica is desirable, and a capillary column made from fused silica currently used abundantly by the present electrophoresis is the most preferred.

[0020] As for a column of this invention, it is preferred that a bulking agent is held inside, and although anything can be used for a bulking agent used for this invention according to the analytic purpose, it is preferred to use a bulking agent for optical resolution, especially a bulking agent which consists of polysaccharide derivatives.

[0021] As long as a polysaccharide which constitutes a polysaccharide derivative used for this invention is optical activity regardless of either a synthetic polysaccharide, a natural polysaccharide and a natural product conversion polysaccharide, what kind of thing may be sufficient as it, but a desirable high thing of the regularity of a bond form is desirable. If it illustrates — beta-1,4-glucan (cellulose) and alpha-1,4-glucan (amylose.) Amylopectin, alpha-1,6-glucan (dextran), beta-1,6-glucan (BUSUTSURAN), Beta-1,3-glucan (for example, curdlan, sizofiran, etc.), alpha-1,3-glucan, beta-1,2-glucan (Crown Gall polysaccharide), beta-1,4-galactan, beta-1,4-mannan, alpha-1,6-mannan, beta-1,2-cell tongue (inulin), It is beta-2,6-cell tongue (levan), beta-1,4-xylan, beta-1,3-xylan, beta-1,4-chitosan, alpha-1,4-N-acetyl chitosan (kitchen), pullulan, agarose, alginic acid, etc., and starch containing amylose is also contained. In these, cellulose which can obtain a polysaccharide of a high grade easily, amylose, beta-1,4-xylan, beta-1,4-chitosan, a kitchen, beta-1,4-mannan, inulin, curdlan, etc. are preferred, and especially cellulose and amylose are preferred.

[0022] Although a number average degree of polymerization (pyranose contained in one molecule or mean number of a furanose ring) of these polysaccharides is ten or more still more preferably and a maximum in particular does not have it five or more preferably, it is desirable that it is 500 or less in respect of an ease of handling.

[0023] A compound produced by derivatizing when an ester bond, a urethane bond, or an ether bond makes some hydroxyl groups of the above polysaccharides carry out a compound which has a functional group which can react to this hydroxyl group by a publicly known method conventionally as a polysaccharide derivative used for this invention is mentioned. As a compound which has a functional group which can react to a hydroxyl group here, An isocyanic acid derivative, carboxylic acid, ester, acid halide, an acid amide, If it is a compound which has a halogenide, an epoxy compound, aldehyde, alcohol, or other leaving groups, what kind of thing may be used and such aliphatic series, alicycle fellows, aromatic series, hetero aromatic compounds, etc. can use inorganic acid, such as nitric acid. Especially an ester derivative or a carbamate derivative is preferred.

[0024] The polysaccharide derivative can fill up a column with a method and the polysaccharide derivative itself which a carrier indicated below is made to support by any methods, such as crushing or the method of spherical-particle-izing.

[0025] Support here may be that a polysaccharide derivative is fixed on a carrier, and what kind of methods, such as physical adsorption between a polysaccharide derivative and a carrier, a chemical bond between carriers, a chemical bond of polysaccharide derivatives, a chemical bond of the third component, an optical exposure to a polysaccharide derivative, and a radical reaction, may be sufficient as the method. Furthermore, a porosity organicity carrier or a porosity inorganic carrier is raised, and a carrier here is a porosity inorganic carrier preferably. In order that silica gel may be raised as a desirable carrier and the surface may eliminate influence of a residual silanol especially, it is preferred that a surface treatment is performed, but it is satisfactory even if a surface treatment is not performed at all.

[0026] In these bulking agents, a thing in which carried out the polymerization reaction of a carrier which has a polymerization nature functional group, a polysaccharide derivative which has a polymerization nature functional group, and the polymerization nature monomer, and a chemical bond was made to form among these 3 persons is preferred.

[0027] As long as it is a functional group which can participate in polymerization reactions, such as a radical polymerization, anionic polymerization, cationic polymerization, and a polycondensation, as a polymerization nature functional group introduced into a carrier, what kind of thing may be used, but a vinyl group represented by an acrylic acid derivative, a methacrylic acid derivative, styrene, etc. is more desirable.

[0028] If it is a functional group which can participate in polymerization reactions, such as a radical polymerization, anionic polymerization, cationic polymerization, and a polycondensation, as a polymerization nature functional group introduced into a polysaccharide derivative. Although what kind of thing may be used, a vinyl group represented by an acrylic acid derivative, a methacrylic acid derivative, styrene, etc. is more desirable. A rate of a polymerization nature functional group introduced to a polysaccharide derivative has the preferred degree of functional group substitution of 0.01–2.9 as a degree of substitution of pyranose or three hydroxyl groups of a furanose ring, and 0.1 to 1.5 is still more preferred.

[0029] As long as it is a monomer which can participate in polymerization reactions, such as a radical polymerization, anionic polymerization, cationic polymerization, and a polycondensation, as a polymerization nature monomer, what kind of thing may be used, but it is a vinyl monomer more preferably represented by an acrylic acid derivative, a methacrylic acid derivative, styrene, etc.

[0030] A column for separation of this invention may be useful as a column for liquid chromatography, especially a column for high performance chromatography, and which thing of a drainage system and an organic solvent system may be sufficient as a mobile phase used for this liquid chromatography method.

[0031] A capillary column of this invention only not only in a liquid chromatography method, gas chromatography, an object for electrophoresis especially an object for capillary tube electro chromatography (for CEC), the CZE (capillary zone electrophoresis) method, and MEKC (micell **** chromatography) -- it can be used also as a capillary column of law.

[0032] If a column for separation of this invention is used, various optical isomers are efficiently separable.

[0033]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention still in detail, this invention is not limited to these examples.

[0034] Example 1: Dilute hydrochloric acid and ion exchange water were dipped after alkali pretreatment to a fused silica capillary column manufacture 75 micrometers in inside diameter of the capillary column which has fritto, and 18.5 cm in length, and it often dried by aeration of dry nitrogen after washing and acetone dipping.

[0035] 100 mg of polyethylene glycols (average molecular weight 10,000 [about]) and 0.45 ml of tetramethoxy silanes were added into 1 ml of acetic acid solutions (0.01M), and it stirred for 30 minutes in the ice bath. Then, it deaerated with the ultrasonic wave, and it introduced until it became a length of 1 cm at the above-mentioned capillary column. Both ends were closed with silicone rubber and it was made to react at 40 ** overnight. Distilled water washed after the reaction, it heated at 50 **, and the capillary column which has fritto was obtained.

[0036] Example 2 : Under the manufacture nitrogen atmosphere of the capillary column which has the fritto in which the bulking agent is held inside, 200 ml of dry pyridine is added to 10 g of cellulose (trade name Avicel, Merck Co. make). After adding 20.6 g of triphenylmethyl chlorides (chloridation trityl) to this and performing heating and stirring of 24 hours at 115 **, it poured in to the methanol 3L and the cellulosic in which the 6th place was tritylated was obtained.

[0037] This 6-trityl cellulose 10g After dissolving in 150 ml of dry pyridine, After adding 18.6 g of 3,5-dichlorophenyl isocyanates and performing heating and stirring of 48 hours at 115 **, it poured in to the methanol 3L, the 6th place was tritylated, and the 2 or 3rd place obtained 3 and the cellulosic formed into 5-dichlorophenyl carbamate. The obtained 6-trityl 2,3-bis(3,5-dichlorophenyl carbamate)cellulose 10g is added to the mixed solution of the methanol 1L and 0.25 g of concentrated hydrochloric acid. At the room temperature, after stirring, it separated and the 6-hydroxy-2,3-bis(3,5-dichlorophenyl carbamate)cellulose from which the trityl radical of the 6th place was removed was obtained for 12 hours.

[0038] This was taken 5g, after dissolving in 70 ml of dry pyridine, after adding 405 mg of 4-vinylphenylisocyanates and performing heating and stirring of 24 hours at 115 **, 1.05 g of 3,5-dichlorophenyl isocyanates were added, and heating and stirring of 24 hours were performed at 115 more **. The reaction mixture was poured into methanol of 2L, and the cellulose 3 and 5-dichlorophenyl carbamate derivative (henceforth [CVDCPC]) in which the polymerization nature vinylphenyl carbamate was introduced into a part of the 6th place of the purpose were obtained. The degree of substitution of a polymerization nature vinylphenyl carbamate is 0.25.

[0039] On the silica gel (the particle diameter of 3 micrometers, 1000A in aperture) which introduced the vinyl group by the conventional surface treatment method, CVDCPC64mg and 6.4 mg of styrene were dissolved in 0.9 ml of tetrahydrofurans (THF), 2,2'-azobisisobutyronitrile (azobisisobutironitoriru) / THF (1.0 ml) solution 2.78-mg were added to this, the polymerization reaction of 20 hours was performed at 60 **, and the bulking agent was obtained.

[0040] The column which has the fritto which distributed 1 ml of hexane-isopropanol (9:1) and created 10 mg of this bulking agent in Example 1 was filled up with the pressure of 400 kg/cm², and the capillary column which has the fritto in which the bulking agent is held was obtained.

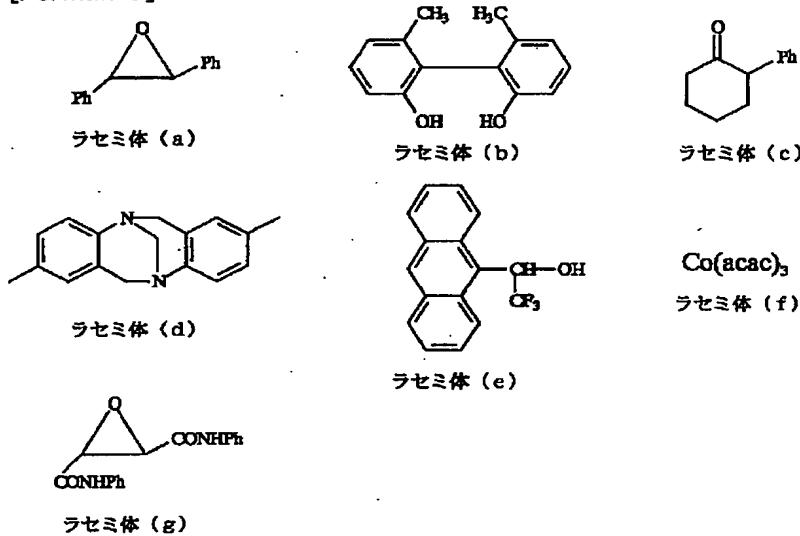
[0041]It is made to be the same as that of Examples 1 and 2 instead of a fused silica capillary column 75 micrometers in inside diameter, and 18.5 cm in length except using a fused silica capillary column 100 micrometers in inside diameter, and 25.0 cm in length. The capillary column which has the fritto in which the bulking agent is held was obtained.

[0042]The capillary column obtained in example 4 Examples 2 and 3 is used, and it is Prince capillary electrophoresis instrument. System (Lauerlabs, Emmen, The Metherlands), Optical resolution was performed by the following condition about 7 sorts of racemate (a) – (g) shown below, using JASCO CE 971 UV Intelligent (made by Jasco Corp.) as a detector. The result is shown in Table 1. A separation factor (alpha) is defined by the following formulas in Table 1.

[0043]The retention coefficient of alpha=k₂' / optical isomer in which 'the retention coefficient of the optical isomer in which k₁' is held weaker here, and k₂' are held more strongly is shown k₁.

[0044]

[Formula 2]



[0045]mobile phase: — hexane/isopropanol =9/1 (v/v)

Detection :UV214nm pump liquid sending (pressure constant method for BET method): 20bar [0046]
[Table 1]

	分離係数 (α)	
	実施例2のカラム	実施例3のカラム
ラセミ体(a)	1.61	1.47
ラセミ体(b)	1.20	1.07
ラセミ体(c)	1.25	1.26
ラセミ体(d)	1.42	1.36
ラセミ体(e)	1.22	1.17
ラセミ体(f)	1.50	1.55
ラセミ体(g)	1.35	1.31

[0047]

[Effect of the Invention]According to this invention, reappearance is good and the column for separation with the fritto which is rich in stability can be manufactured simply.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-350413

(P2002-350413A)

(43)公開日 平成14年12月4日 (2002.12.4)

(51)Int.Cl.
G 0 1 N 30/48

識別記号

F I
G 0 1 N 30/48

テ-マコ-ト^{*} (参考)
K 4 C 0 4 8
N 4 C 0 5 0
W 4 H 0 0 6

C 0 7 B 57/00

3 4 0
3 4 3

C 0 7 B 57/00

3 4 0
3 4 3

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-155232(P2001-155232)

(71)出願人 000002901

ダイセル化学工業株式会社
大阪府堺市鉄砲町1番地

(22)出願日 平成13年5月24日 (2001.5.24)

(72)発明者 岡本 佳男

愛知県名古屋市東区矢田町2-66-222

(72)発明者 ベツアン・チャンクベターゼ
ジョージア共和国トビリシ380028, チャフ
チャバーズ・アフ・1, トビリシ・ステイ
ト・ユニバーシティ, デパートメント・オ
ブ・ケミストリー

(74)代理人 100063897

弁理士 古谷 騰 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分離用カラム

(57)【要約】

【課題】 再現良く、簡易に製造でき、安定性に富むフ
リットを持った分離用カラム及びそれを用いた光学異性
体の分離方法の提供。

【解決手段】 アルコキシシランの脱水縮合反応により
得られるフリットを有することを特徴とする分離用カラ
ム、アルコキシシラン溶液を導入したカラム内で脱水縮
合反応を行う分離用カラムの製造方法、及びこの分離用
カラムを用い、光学異性体を分離することを特徴とする
光学異性体の分離方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルコキシシランの脱水縮合反応により得られるフリットを有することを特徴とする分離用カラム。

【請求項2】 内部に充填剤が保持されていることを特徴とする請求項1記載の分離用カラム。

【請求項3】 充填剤が光学分割用充填剤であることを特徴とする請求項1又は2記載の分離用カラム。

【請求項4】 充填剤が多糖誘導体からなることを特徴とする請求項3記載の分離用カラム。

【請求項5】 高速液体クロマトグラフィー用カラムであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の分離用カラム。

【請求項6】 キャピラリー電気泳動法に用いられるカラムであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の分離用カラム。

【請求項7】 アルコキシシラン溶液を導入したカラム内で脱水縮合反応を行うことを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の分離用カラムの製造方法。

【請求項8】 請求項1～6のいずれか一項に記載の分離用カラムを用い、光学異性体を分離することを特徴とする光学異性体の分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は分離分析手段である、液体クロマトグラフィー法、キャピラリー電気泳動法、ガスクロマトグラフィー法等に用いられる分離用カラム、その製造方法及びそれを用いた光学異性体の分離方法に関するものである。特に、高感度、微量、迅速分析を可能とする、優れた光学異性体分離用カラムに関するものである。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】多くの有機化合物には光学異性体が存在するが、これら光学異性体の物理的、化学的性質、例えば沸点、融点、溶解度などの物性は全く同一である。しかしながら光学異性体間には生理活性の点でしばしば差異が見られることが広く知られている。このために医薬品の分野においては光学異性体間での薬効、毒性の点で顕著な差が見られる場合がしばしばあり、香料、食品添加物においても、匂い、味の点で差異の見られる場合がある。

【0003】このような社会的な要請のもと、光学異性体の片方のみを製造する手段が広く検討されているが、同時に光学異性体を分析する技術も研究され進展してきた。先に述べたように光学異性体の物理的、化学的性質は全く同一であるために、通常の沸点や溶解度、分配係数、電荷の大きさといった物性の違いによって分離を行う手段では分析が行えない。

【0004】そこで光学異性体間の立体的な配置を室温に近い条件で識別（不斉識別）することが可能な光学異

性体の分離、分析手段として高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法による光学異性体分離方法が進展してきた。ここで用いているHPLC用カラムとは不斉識別剤そのもの、あるいは不斉識別剤を適当な担体上に担持させたキラル固定相が使用されている。例えば、光学活性ポリメタクリル酸トリフェニルメチル（特開昭57-150432号）、セルロース、アミロース誘導体（Y. Okamoto, M. Kawashima and K. Hatada, J. Am. Chem. Soc., 106, 5337, 1984）、オボムコイド（特開昭63-307829号）等が開発されている。これらHPLC用キラル固定相の中でも、セルロース誘導体やアミロース誘導体をシリカゲル上に担持させた光学分割カラムは、非常に幅広い化合物に対し、高い不斉識別能を有することが知られている。

【0005】しかしながらこれらHPLC法において、分離の際にある程度の量（約0.1μg以上）の試料が必要であるが、上述した生体成分、代謝研究等の分野で用いるには、試料の絶対量が極めて微量であるため、例えば10～0.1pgの試料が精度高く分析出来る手法が望まれている。またHPLC法では移動相溶剂量が多量に排出されるこ

とから、これらの溶剂量の削減が環境問題の点から指摘されている。

【0006】また、近年HPLC法とは分離手法の異なるキャピラリー電気泳動法（CE）による光学分割技術の研究が進められている。キャピラリー電気泳動法とは、キャピラリーと呼ばれる細管を用い、両端に電圧を印加することで、電荷、サイズなどの違いにより試料を分離する技術である。従来、CE法を用いた光学分割法は泳動液中にシクロデキストリンやその誘導体を添加して行うCZE（キャピラリーゾーン電気泳動）法、MEKC（ミセル動電クロマト）法が良く知られている（Journal of Chromatography A, 659, (1994) 449）。またシクロデキストリン以外にもヘパリン（Anal. Chem., 66(1994), 3054）、硫酸化多糖類であるガラクトサミン、グルクロン酸、フコース（特開平9-143202号）、デキストラン等（Journal of Chromatography A, 735, (1996) 345）を泳動液に添加した例が報告されている。

【0007】キャピラリーカラムの製造方法には高度な技術を要する。特に、キャピラリー内に充填剤を保持するためのフリットの作製技術が問題となり、キャピラリー電気泳動法では、これが通電を遮断する気泡の問題に関係してくる。

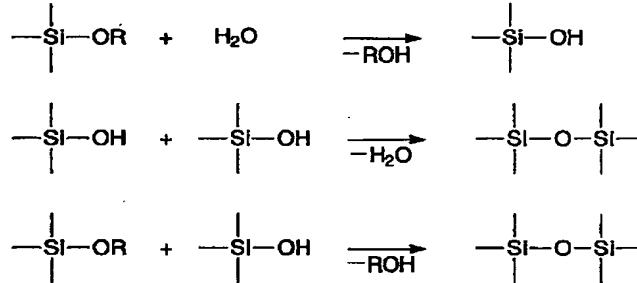
【0008】従来、フリットの作製にはシリカゲル又はその誘導体を焼結させる方法が用いられていたが、フリットの長さの調整が困難な上、加熱部分が折れやすく作製には高度な技術を要した。そのため、フリット作製を不要とするフリットレスカラムの研究も行われている（Anal. Chem., vol. 68, No. 17, 2753-2757, 1996, Electrophoresis, vol. 20, No. 1, 43-49, 1999, Anal. Chem., vol. 72, No. 15, 3605-3610, 2000, Chromatography, vol. 21, No. 3, 195-202, 2000）。

【0009】本発明の目的は、再現良く、簡易に製造でき、安定性に富むフリットを持った分離用カラム及びそれを用いた光学異性体の分離方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決するべく鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち本発明は、アルコキシランの脱水縮合反応により得られるフリットを有することを特徴とする分離用カラム、アルコキシラン溶液を導入した*



(1)

【0014】ここで、Rは無置換又は置換基を有してもよい芳香族炭化水素基、水素原子、炭素数1～20のアルキル基から選ばれる少なくとも1種である。本発明で用いられる好ましいアルコキシランとしては、テトラメトキシラン、テトラエトキシラン、トリメトキシラン、トリエトキシラン、フェニルトリメトキシランなどが挙げられる。また、アルコキシラン単体のみならず、例えばエチレングリコールなどの二価アルコールやエステル類などと共重合させてもよい。

【0015】このようなアルコキシランの脱水縮合反応により、三次元架橋したマトリックスが形成され、これが本発明のフリットとなる。かかるフリットを有する本発明のカラムを製造するには、あらかじめ適当な溶媒中でアルコキシラン溶液を調製した後、この溶液をカラム内に導入し、0℃から180℃で脱水縮合反応を行うのが好ましい。

【0016】アルコキシラン溶液の調製に用いられる溶剤としては、水、アセトン、メチルエチルケトン、アセトフェノン等のケトン系溶剤、酢酸エチル、酢酸メチル、酢酸プロピル、プロピオン酸メチル、安息香酸メチル、酢酸フェニル等のエステル系溶剤、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジエチルエーテル、tert-ブチルメチルエーテル等のエーテル系溶剤、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等のアミド系溶剤、N,N-ジメチルイミダゾリジノン等のイミド系溶剤、クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン系溶剤、ペンタン、石油エーテル、ヘキサン、ヘプタン、オクタ

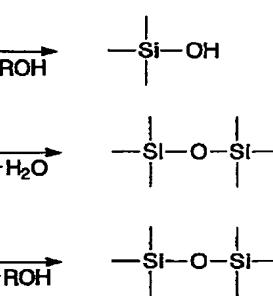
* カラム内で脱水縮合反応を行う分離用カラムの製造方法、及びこの分離用カラムを用い、光学異性体を分離することを特徴とする光学異性体の分離方法である。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明におけるアルコキシランの脱水縮合反応は、式(1)に示すような、シリケートの加水分解とそれに続くシラノール基の縮合反応という素反応からなる。

【0013】

10 【化1】



(1)

ン、ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の炭化水素系溶剤、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール系溶剤、ジエチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン等のアミン系溶剤が挙げられ、これらの溶剤は単独でも2種以上の混合溶剤として用いてもよい。更に加水分解触媒として、酢酸、塩酸、硫酸等の酸、又はアンモニウム、水酸化ナトリウム等の塩基を添加し、アルコキシラン溶液の調製用溶剤とする。アルコキシラン溶液中のアルコキシランの濃度は0.05～5重量%が好ましい。

【0017】カラム内へのアルコキシラン溶液の導入量は特に制限はないが、カラム中のアルコキシラン溶液部分の長さが0.2～4cm、更には0.5～2cmとなるよう導入するのが好ましい。

【0018】本発明に用いられるカラムは通常使用されるものであれば特に限定されないが、カラムの内径は1～5000μmが好ましく、10～1000μmが更に好ましく、

40 10～200μmが特に好ましい。またカラムの長さはいかなる長さでも良いが、20～100cmが好ましい。

【0019】カラムの材質は液体クロマトグラフィーや電気泳動分析の使用に供されるものであれば特に限定されないが、特にガラスないしはシリカを含む材質が望ましく、現在電気泳動で多用されている溶融シリカ製のキャビラリーカラムが最も好ましい。

【0020】本発明のカラムは、内部に充填剤が保持されていることが好ましく、本発明に用いられる充填剤は、分析の目的に応じていかなるものも使用することができますが、光学分割用充填剤、特に多糖誘導体からなる

充填剤を用いるのが好ましい。

【0021】本発明に用いられる多糖誘導体を構成する多糖とは、合成多糖、天然多糖及び天然物変成多糖のいずれかを問わず、光学活性であればいかなるものでもよいが、好ましくは結合様式の規則性の高いものが望ましい。例示すれば β -1, 4-グルカン(セルロース)、 α -1, 4-グルカン(アミロース、アミロペクチン)、 α -1, 6-グルカン(デキストラン)、 β -1, 6-グルカン(ブツラン)、 β -1, 3-グルカン(例えばカードラン、シゾフィラン等)、 α -1, 3-グルカン、 β -1, 2-グルカン(Crown Gall多糖)、 β -1, 4-ガラクトン、 β -1, 4-マンナン、 α -1, 6-マンナン、 β -1, 2-フラクトン(イヌリン)、 β -2, 6-フラクトン(レパン)、 β -1, 4-キシラン、 β -1, 3-キシラン、 β -1, 4-キトサン、 α -1, 4-N-アセチルキトサン(キチン)、フルラン、アガロース、アルギン酸等であり、アミロースを含有する澱粉も含まれる。これらの中では、高純度の多糖を容易に入手できるセルロース、アミロース、 β -1, 4-キシラン、 β -1, 4-キトサン、キチン、 β -1, 4-マンナン、イヌリン、カードラン等が好ましく、特にセルロース、アミロースが好ましい。

【0022】これら多糖の数平均重合度(1分子中に含まれるピラノースあるいはフラノース環の平均数)は好ましくは5以上、更に好ましくは10以上であり、特に上限はないが、500以下であることが取り扱いの容易さの点で望ましい。

【0023】本発明に用いられる多糖誘導体としては、上記のような多糖の水酸基の一部に該水酸基と反応しうる官能基を有する化合物を、従来公知の方法でエステル結合、ウレタン結合、あるいはエーテル結合等させることにより誘導体化して得られる化合物が挙げられる。ここで水酸基と反応しうる官能基を有する化合物としては、イソシアニ酸誘導体、カルボン酸、エステル、酸ハライド、酸アミド、ハロゲン化物、エポキシ化合物、アルデヒド、アルコール、あるいはその他脱離基を有する化合物であればいかなるものでもよく、これらの脂肪族、脂環族、芳香族、ヘテロ芳香族化合物等、更には硝酸等の無機酸を用いることができる。特にエステル誘導体又はカルバメート誘導体が好ましい。

【0024】多糖誘導体は、下記に記載する担体に担持させる方法、多糖誘導体自身を破碎、あるいは球状粒子化する方法等のいずれの方法によってもカラムに充填することができる。

【0025】ここでいう担持とは、担体上に多糖誘導体が固定化されていることであり、その方法は多糖誘導体と担体との間の物理的な吸着、担体との間の化学結合、多糖誘導体同士の化学結合、第三成分の化学結合、多糖誘導体への光照射、ラジカル反応などいかなる方法でも

良い。さらにここでいう担体とは、多孔質有機担体又は多孔質無機担体があげられ、好ましくは多孔質無機担体である。特に好ましい担体としてシリカゲルがあげられ、その表面は残存シラノールの影響を排除するために表面処理が施されていることが好ましいが、全く表面処理が施されていないなくても問題ない。

【0026】これらの充填剤の中では、重合性官能基を有する担体、重合性官能基を有する多糖誘導体及び重合性モノマーを重合反応させて、これら3者間で化学結合を形成させたものが好ましい。

【0027】担体に導入する重合性官能基としてはラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合、重縮合などの重合反応に関与することのできる官能基であれば、いかなるものでも良いが、アクリル酸誘導体、メタクリル酸誘導体、スチレンなどに代表されるビニル基がより望ましい。

【0028】多糖誘導体に導入する重合性官能基としてはラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合、重縮合などの重合反応に関与することのできる官能基であれば、いかなるものでも良いが、アクリル酸誘導体、メタクリル酸誘導体、スチレンなどに代表されるビニル基がより望ましい。多糖誘導体へ導入される重合性官能基の割合は、ピラノースあるいはフラノース環の3個の水酸基の置換度として0.01から2.9の官能基置換度が好ましく、0.1から1.5が更に好ましい。

【0029】重合性モノマーとしてはラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合、重縮合などの重合反応に関与することのできるモノマーであればいかなるものでも良いが、より好ましくはアクリル酸誘導体、メタクリル酸誘導体、スチレンなどに代表されるビニルモノマーである。

【0030】本発明の分離用カラムは、液体クロマトグラフィー用カラム、特に高速液体クロマトグラフィー用カラムとして有用であり、この液体クロマトグラフィー法に用いる移動相は、水系、有機溶剤系のいずれのものでも構わない。

【0031】また本発明のキャピラリーカラムは、液体クロマトグラフィー法のみならず、ガスクロマトグラフィー、電気泳動用、特にキャピラリーエレクトロクロマトグラフィー用(CEC用)、CZE(キャピラリーゾーン電気泳動)法、MEKC(ミセル動電クロマト)法のキャピラリーカラムとしても使用することができる。

【0032】本発明の分離用カラムを用いると、各種光学異性体を効率よく分離することができる。

【0033】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0034】実施例1：フリットを有するキャピラリーカラムの製造

内径 $75\mu\text{m}$ 、長さ 18.5cm のフューズドシリカキャピラリーカラムに対してアルカリ前処理後、希塩酸、イオン交換水を通液し、よく洗浄後、アセトン通液後、乾燥窒素の通気により乾燥した。

【0035】酢酸水溶液(0.01M) 1ml中にポリエチレングリコール(平均分子量約10,000) 100mg、テトラメトキシシラン0.45mlを加えて氷浴中で30分間攪拌した。その後、超音波により脱気し、上記のキャピラリーカラムに1cmの長さになるまで導入した。両端をシリコーンゴムで閉じ、40°Cで一晩反応させた。反応後、蒸留水で洗浄し、50°Cで加熱し、フリットを有するキャピラリーカラムを得た。

【0036】実施例2：内部に充填剤が保持されているフリットを有するキャピラリーカラムの製造
窒素雰囲気下、セルロース(商品名アビセル、メルク社製) 10gに乾燥ピリジン200mlを加え、これに塩化トリフェニルメチル(塩化トリチル) 20.6gを加えて115°Cで24時間の加熱・攪拌を行った後、メタノール3Lへ注ぎ込み、6位がトリチル化されたセルロース誘導体を得た。

【0037】この6-トリチルセルロース10gを乾燥ピリジン150mlに溶解後、3,5-ジクロロフェニルイソシアネート18.6gを加えて115°Cで48時間の加熱・攪拌を行った後、メタノール3Lへ注ぎ込み、6位がトリチル化され2,3位が3,5-ジクロロフェニルカルバメート化されたセルロース誘導体を得た。得られた6-トリチル-2,3-ビス(3,5-ジクロロフェニルカルバメート)セルロース10gをメタノール1Lと濃塩酸0.25gの混合溶液に添加し、12時間、室温で攪拌後、濾取し、6位のトリチル基を除去した6-ヒドロキシ-2,3-ビス(3,5-ジクロロフェニルカルバメート)セルロースを得た。

【0038】これを5gとり乾燥ピリジン70mlに溶解後、4-ビニルフェニルイソシアネート405mgを加えて15°Cで24時間の加熱・攪拌を行った後、3,5-ジクロロフェニルイソシアネート1.05gを添加し、さらに115°Cで24時間の加熱・攪拌を行った。反応混合物を2Lのメタノールに注ぎ込み、目的の6位の一部に重合性ビニルフェニルカルバメートが導入されたセルロース3,5-ジクロ

ロフェニルカルバメート誘導体(以下CVDGPCという)を得た。重合性ビニルフェニルカルバメートの置換度は0.25である。

【0039】従来の表面処理法によりビニル基を導入したシリカゲル(粒径 $3\mu\text{m}$ 、孔径 1000\AA)上で、CVDGPC 64mgとスチレン6.4mgをテトラヒドロフラン(THF)0.9mlに溶解させ、これに2.78mgの2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)/THF(1.0ml)溶液を加え、60°Cで20時間の重合反応を行い、充填剤を得た。

【0040】この充填剤10mgを、ヘキサン-イソプロパノール(9:1) 1mlに分散させ、実施例1で作成したフリットを有するカラムに、 $400\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧力で充填して、充填剤が保持されているフリットを有するキャピラリーカラムを得た。

【0041】実施例3
内径 $75\mu\text{m}$ 、長さ 18.5cm のフューズドシリカキャピラリーカラムの代わりに、内径 $100\mu\text{m}$ 、長さ 25.0cm のフューズドシリカキャピラリーカラムを用いる以外は、実施例1及び2と同様にして、充填剤が保持されているフリットを有するキャピラリーカラムを得た。

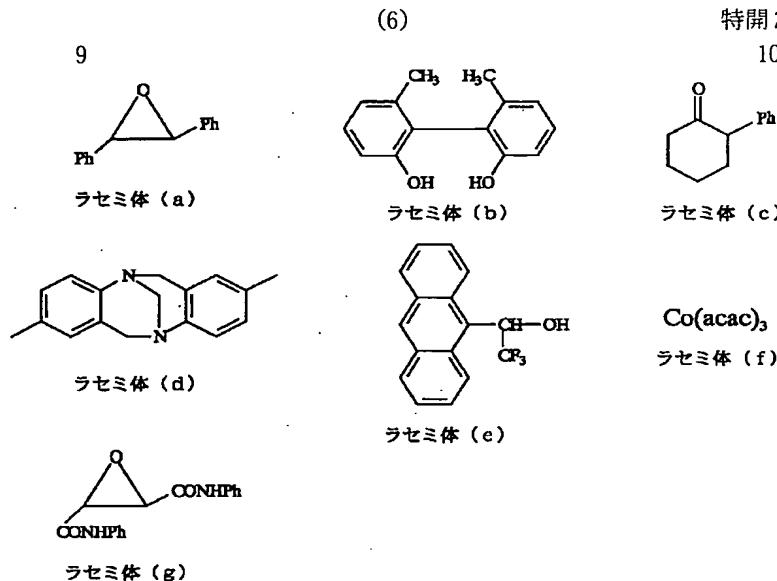
【0042】実施例4
実施例2及び3で得られたキャピラリーカラムを用い、Prince capillary electrophoresis instrument (Lauer labs, Emmen, The Netherlands)システム、検出器としてJASCO CE 971 UV Intelligent(日本分光社製)を用い、以下に示す7種のラセミ体(a)～(g)について、下記条件で光学分割を行った。その結果を表1に示す。なお、表1において、分離係数(α)は、以下の式で定義される。

$$[\alpha] = k_{z'} / k_{i'}$$

ここで、 $k_{i'}$ はより弱く保持される光学異性体の保持係数、 $k_{z'}$ はより強く保持される光学異性体の保持係数を示す。

【0044】

【化2】



【0045】移動相：ヘキサン／イソプロパノール=9

／1 (v/v)

検出：UV214nm

ポンプ送液（定圧法）：20bar

【0046】

【表1】

	分離係数 (α)	
	実施例2のカラム	実施例3のカラム
ラセミ体(a)	1.61	1.47
ラセミ体(b)	1.20	1.07
ラセミ体(c)	1.25	1.26
ラセミ体(d)	1.42	1.36
ラセミ体(e)	1.22	1.17
ラセミ体(f)	1.50	1.55
ラセミ体(g)	1.35	1.31

* 【0047】

【発明の効果】本発明によると、再現良く、安定性に富むフリットを持った分離用カラムを、簡易に製造することができる。

20

30

*

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷
 C 07 B 57/00
 C 07 C 33/46
 39/15
 49/657
 49/92
 C 07 D 301/32
 303/04
 303/48
 487/08
 G 01 N 27/447
 30/88

識別記号
350

F I
 C 07 B 57/00
 C 07 C 33/46
 39/15
 49/657
 49/92
 C 07 D 301/32
 303/04
 303/48
 487/08
 G 01 N 30/88
 C 07 M 7:00

テーマコード（参考）

350

W

(7)

特開2002-350413

// C O 7 M 7:00

G O 1 N 27/26

3 3 1 G

3 1 1 E

(72)発明者 山本 智代
愛知県春日井市神屋町654-265
(72)発明者 脇田 常希
三重県多気郡多気町牧245

F ターム(参考) 4C048 AA01 BB02 BB33 CC01 KK07
UU10 XX03
4C050 AA03 AA07 BB08 CC08 DD10
EE02 FF02 GG01 HH01
4H006 AA02 AC83 AD17 FC52 FC54
FE11 FE13 FE71 FE74